

別記様式第 6 号（第 16 条第 3 項，第 25 条第 3 項関係）

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	Muhammad Phetrus Johan
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Metastatic Tumor Cells Detection and Anti-Metastatic Potential with Vesicular Stomatitis Virus in Immunocompetent Murine Model of Osteosarcoma (水疱性口内炎ウイルスを用いた免疫応答性骨肉腫マウスモデル中の転移性腫瘍細胞の検出と抗転移効果の可能性)			
論文審査担当者			
主 査	教授	安井 弥	印
審査委員	教授	小林正夫	
審査委員	准教授	田中友加	
〔論文審査の結果の要旨〕 <p>骨肉腫は小児期に発生する最も多い原発性悪性骨腫瘍である。手術、化学療法、放射線治療併用の集学的療法が施行されているにも関わらずその生存率は約 70%で過去 20 年間ではほぼ改善していない。腫瘍溶解ウイルスの 1 つである水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus; VSV)は様々な種類の癌腫に選択的に感染し、溶解させる新しい治療法として注目されている。これまで申請者の研究室では骨肉腫マウスの原発巣に対する VSV の治療効果を報告してきたが、本研究では肺転移巣に対する VSV の有用性について研究解析を行った。</p> <p>赤色蛍光蛋白 Katushka を遺伝子導入した VSV(rVSV-K)を作成し、高肺転移骨肉腫マウスモデルに投与して肺転移抑制効果を評価すること、及び rVSV-K の血中循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells ; CTCs)検出能力を検討した。</p> <p>方法は、<i>in vitro</i>において、種々のヒト及びマウス骨肉腫細胞と正常なヒト間葉系幹細胞 (MSCs)に対して rVSV-K を感染させ、顕微鏡的に細胞傷害効果と赤色蛍光発現を評価した。細胞増殖抑制効果についてはテトラゾリウム塩(WST-8)法にて評価した。ウイルス RNA 発現はリアルタイム PCR によって評価した。In vivo 骨肉腫マウスモデルは、immunocompetent C3H 雄マウスに、高肺転移骨肉腫細胞株 LM8 を背部に移植し作成した。静脈内投与にて rVSV-K 単回投与群、間欠的投与（週 1 回 4 週間）群を作成し、生食投与群との比較を行った。評価は原発巣の体積を毎週測定、腫瘍移植後 5 週の肺転移巣の組織学的評価、およびカプランマイヤー法により生存率を比較検討した。CTCs 検出能の評価は腫瘍移植 5 週間後の骨肉腫マウスより採取した血液に rVSV-K を感染させ、CD45 抗体、DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)での免疫蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡にて CTCs を確認した。</p> <p>得られた結果は以下のように要約される。</p> <p>rVSV-K はすべてのヒト及びマウス骨肉腫細胞にて低濃度(0.01MOI)感染で細胞傷害効果</p>			

を示し、MSC では高濃度(1MOI)の感染でも変化は認めなかった。ウイルス感染させた骨肉腫細胞のみ赤色蛍光の発現がみられた。細胞増殖抑制効果は 0.01MOI での感染で全ての骨肉腫細胞において MSC に比較し強力な増殖抑制効果が見られた。ウイルス感染後 48 時間において MSC に比べ骨肉腫細胞ではウイルス RNA 遺伝子の発現上昇を認めた。骨肉腫マウスへの投与実験では原発巣においていずれの治療群においてもコントロール群と比較し腫瘍体積の有意な減少は認めなかった。肺転移数については単回投与群はコントロール群と比較し有意差を認めなかったが、間欠的投与群では統計学的に有意な減少を認め (student t-test, $p < 0.01$)、生存日数の有意な延長 (log-rank test, $p < 0.01$) も見られた。LM8 骨肉腫マウスモデルより採取した血液に rVSV-K を感染させると、赤色蛍光発現を認める有核細胞(DAPI 染色陽性、CD45 染色陰性)を認め、本法による CTCs 細胞の検出が可能であることが示唆された。

以上の結果から、本論文は腫瘍溶解ウイルス VSV が骨肉腫マウスにおいて肺転移抑制効果を有し、CTCs の検出可能性をも示唆したものであり、骨肉腫をはじめとした肉腫患者に対する今後のウイルス療法の発展に資すること大である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	Muhammad Phetrus Johan
学 位 授 与 の 条 件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目 Metastatic Tumor Cells Detection and Anti-Metastatic Potential with Vesicular Stomatitis Virus in Immunocompetent Murine Model of Osteosarcoma (水疱性口内炎ウイルスを用いた免疫応答性骨肉腫マウスモデル中の転移性腫瘍細胞の検出と抗転移効果の可能性)			
最終試験担当者			
主 査	教授	安井 弥	印
審査委員	教授	小林正夫	
審査委員	准教授	田中友加	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
上記 3 名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成 30 年 8 月 2 日の第 75 回広島大学研究科発表会（医学）及び平成 30 年 7 月 31 日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
1. 腫瘍溶解ウイルス VSV の感染メカニズム			
2. VSV の副作用、免疫系への影響			
3. 血中循環腫瘍細胞の意義と検出法			
4. 骨肉腫治療の現状と課題			
5. 本研究成果の臨床応用の可能性			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するのに必要な学識を有するものと認めた。			